

〈新技術特集〉

## BNP測定試薬用の精度管理物質 「BNPコントロール シオノギ」について

増田 景一

### Introducing BNP Control Shionogi, Quality Control Material for BNP Measurement Kits

Keiichi Masuta

**Summary** Numerous kits for measuring B-type natriuretic peptide (BNP) are commercially available in Japan, and the measurement values among these kits need to be standardized. Moreover, according to the 2018 revision of the Ordinance for Medical Service Act established by the Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare, laboratories that measure clinical specimens must implement quality control (QC). Shionogi & Co., Ltd. recently launched BNP Control Shionogi, a plasma-based lyophilized QC material for BNP measurement kits that users can store in refrigerated conditions. To reflect actual clinical specimens, the product contains two molecular forms of BNP found in human plasma: proBNP and BNP-32. Two concentrations are available, 40 ng/L and 200 ng/L, and reference value ranges are assigned for each lot using an immunoradiometric assay as a standard measurement procedure. The reconstituted material is stable for up to 6 hours at 8°C and 4 weeks at -20°C .

**Key words:** B-type natriuretic peptide (BNP), proBNP, Quality control material

#### I. 緒言

ヒト脳性ナトリウム利尿ペプチド（以下、BNP）は、主として心室から血液中に分泌されるホルモンであり<sup>1,2)</sup>、血漿中BNP濃度は健常人では極めて低いが、慢性及び急性心不全患者ではその重症度に応じて著明に増加する<sup>3)</sup>ことが知られている。日本や欧米の心不全診療に関するガイドライン<sup>4,6)</sup>では、BNPは心不全及びそ

の重症度の診断に有用なバイオマーカーであるとされている。日本の「急性・慢性心不全診療ガイドライン（2017年改訂版）」<sup>6)</sup>において、BNPのカットオフ値がTable 1のとおり示されている。

BNP測定用キットは、日本国内においても各社から数多く販売されている。国内では、免疫放射測定法（immunoradiometric assay、IRMA法）「シオノリア® BNP」が最初に薬事承認を受け

塩野義製薬株式会社バイオマーカー研究開発部  
〒561-0825 大阪府豊中市二葉町3-1-1  
Tel: +81-6-6331-7422  
Fax: +81-6-6331-8972  
E-mail: keiichi.masuta@shionogi.co.jp

Biomarker R&D Department  
Shionogi & Co., Ltd.  
1-1, Futaba-cho 3-chome, Toyonaka, Osaka 561-0825  
Japan

## 生 物 試 料 分 析

Table 1 BNPのカットオフ値（文献<sup>6)</sup>より引用）

血漿中 BNP 濃度 (ng/L)	判断
～18.4	心不全の可能性は極めて低い
18.4～40	心不全の可能性は低い、可能ならば経過観察
40～100	軽度の心不全の可能性があるので精査、経過観察
100～200	治療対象となる心不全の可能性があるので精査あるいは専門医に紹介
200～	治療対象となる心不全の可能性が高いので精査あるいは専門医に紹介

(注)BNP 濃度の単位には、一般的に「pg/mL」が用いられている。

て1993年に発売され、その後に発売された各キットは、この「シオノリア® BNP」又は薬事承認若しくは認証を受けた他の既存のキットと測定値の互換性を維持するよう開発されてきた。日本国内で販売されているBNP測定用キットを Table 2に示す。これらのキットについて、一定

の相関性は示すものの<sup>7)</sup>、キット間でBNP測定値の乖離を認めるとの報告<sup>8)</sup>が散見される。今後、BNP測定値のキット間差を小さくする標準化が求められる。

また、医療法等の一部を改正する法律（平成29年法律第57号）が平成29年（2017年）6月に

Table 2 日本国内で販売されているBNP測定用キット

承認・認証年月	販売名	測定原理	製造販売業者
2002/12	E テスト「TOSOH」II (BNP)	酵素免疫測定法 (EIA 法 <sup>1)</sup> )	東ソー株式会社
2004/10	パスファースト BNP	化学発光酵素免疫測定法 (CLEIA 法 <sup>2)</sup> )	株式会社 LSI メディエンス
2006/03	スポット BNP アッセイキット	イムノクロマト法	アボットダイアグノスティクスメディカル株式会社
2008/06	BNP-JP・アボット	化学発光免疫測定法 (CLIA 法 <sup>3)</sup> )	アボット ジャパン合同会社
2008/08	ケミルミ BNP	化学発光免疫測定法 (CLIA 法)	シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス株式会社
2008/09	デタミナー®CL BNP	化学発光酵素免疫測定法 (CLEIA 法)	日立化成ダイアグノスティックス・システムズ株式会社
	デタミナー®CL BNP (NX)		
2009/01	ラピッドチップ®BNP	イムノクロマト法	積水メディカル株式会社
2010/11	ルミパルス® BNP	化学発光酵素免疫測定法 (CLEIA 法)	富士レビオ株式会社
2010/11	ルミパルスプレスト® BNP	化学発光酵素免疫測定法 (CLEIA 法)	富士レビオ株式会社
2010/12	ステイシア CLEIA BNP	化学発光酵素免疫測定法 (CLEIA 法)	株式会社 LSI メディエンス
2012/11	フレックスカートリッジ BNP V	化学発光免疫測定法 (CLIA 法)	シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス株式会社
2015/06	AIA-パック CL® BNP	化学発光酵素免疫測定法 (CLEIA 法)	東ソー株式会社
2016/09	ナノピア®BNP	ラテックス免疫比濁法	積水メディカル株式会社
2018/02	ナノピア®BNP-A	ラテックス免疫比濁法	積水メディカル株式会社

\*1: Enzyme Immunoassay \*2: Chemiluminescent Enzyme Immunoassay \*3: Chemiluminescent Immunoassay  
2021年5月末時点で販売中のキットのみを記載した。製造販売業者の情報も2021年5月末時点のものである。同一の販売名で使用する測定機器が異なるキットの記載は省略した。

Table 3 医療法改正後の検体検査業務を行う病院・診療所等における精度管理の基準

<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 検体検査の精度の確保に係る責任者の選任義務</li> <li>✓ 「検査機器保守管理標準作業書」、「測定標準作業書」の作成、「検査機器保守管理作業日誌」、「測定作業日誌」の記載義務</li> <li>✓ 「試薬管理台帳」、「統計学的精度管理台帳（<u>内部精度管理台帳</u>）」、「<u>外部精度管理台帳</u>」の作成義務</li> <li>✓ <u>内部精度管理の実施</u>の努力義務*</li> <li>✓ <u>外部精度管理調査の受検</u>の努力義務*</li> <li>✓ 検査業務従事者に対する適切な研修の実施の努力義務*</li> </ul>
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

※遺伝子関連・染色体検査を行う場合は義務

公布され、検体検査業務を行う病院・診療所等における精度管理の基準の明確化に関する改正が平成30年（2018年）12月1日に施行された。この法改正及び関連する厚生労働省令の改正では、自ら検体検査を実施する医療機関に対して、内部精度管理の実施と外部精度管理調査の受検が努力義務として課せられた他、検体検査の精度の確保に係る責任者の選任、標準作業書の作成等も義務化された（Table 3）<sup>10)</sup>。そのため、内部精度管理用物質、いわゆるコントロール試料のニーズが高まっている。

BNPのコントロール試料として、BNP測定用キットの製造販売業者が販売している製品もあるが、それらは基本的に各社のキット専用に設計されており、別のキットでは使用できない。仮に別のキットで使用した場合、参考値どおりの測定結果が得られるとは限らず、精度管理用途には不適である。血漿を測定対象とするすべてのBNP測定キットで使用可能なコントロール試料として、塩野義製薬株式会社は「BNPコントロール シオノギ」を2019年10月に発売した。本稿では、この製品の開発コンセプトと特徴を紹介し、基本的性能について説明する。

## II . 製品の開発コンセプト

### 1. 血中でのBNPの存在様式

近年の研究において、血液中のBNPの分子形には、前駆体のproBNP [1-108]（以下、単にproBNP）からアミノ酸32個が切断され生理活性を有するproBNP [77-108]（以下、BNP-32）だけでなく、proBNP自身も存在することが明らかにされている<sup>11,12)</sup>。生体内でproBNP及び

BNP-32が産生される過程<sup>13)</sup>の概要をFig. 1に示す。BNPのmRNAが翻訳され産生されたpreproBNPからシグナルペプチドが外れてproBNPとなり、proBNPのN端領域計7か所で糖鎖修飾が起きる。心筋細胞から血中に放出される際、切断酵素のfurinによりN端proBNP（proBNP [1-76]）とBNP-32とに分かれるが、切断されずproBNPのまま血中に放出されるものもある。このfurinによる切断は、糖鎖修飾部位のうち、切断部位に最も近い71位のアミノ酸トレオニンへの糖鎖結合の有無が関係している。

### 2. BNP測定キットの反応性

各社が販売しているBNP測定キットは、BNP-32と結合する抗体が使用されている。BNP-32と結合する抗体は、BNP-32のN末端を特異的に認識する抗体でない限り、同じアミノ酸配列を有するproBNPとも結合する（Fig. 2）。このため、各社のBNP測定キットで測定しているBNP濃度は、proBNPとBNP-32の総和となる。また、サンドイッチアッセイの原理上、proBNPとの交差反応は、ヒト脳性ナトリウム利尿ペプチド前駆体N端フラグメント（NT-proBNP）測定キットでも同様である。

### 3. 血中でのBNPの各分子形の存在比率

著者らは以前、臨床検体におけるproBNPの存在比率を検討した。Nishikimiらが開発した、proBNPのみを分別して測定する試薬及びBNP-32とproBNPの和（total BNP）を測定する試薬（いずれもマイクロプレートを用いた化学発光酵素免疫測定法による測定キット）<sup>14)</sup>を用いて、患者検体60例を対象に、血漿中のproBNPの存在

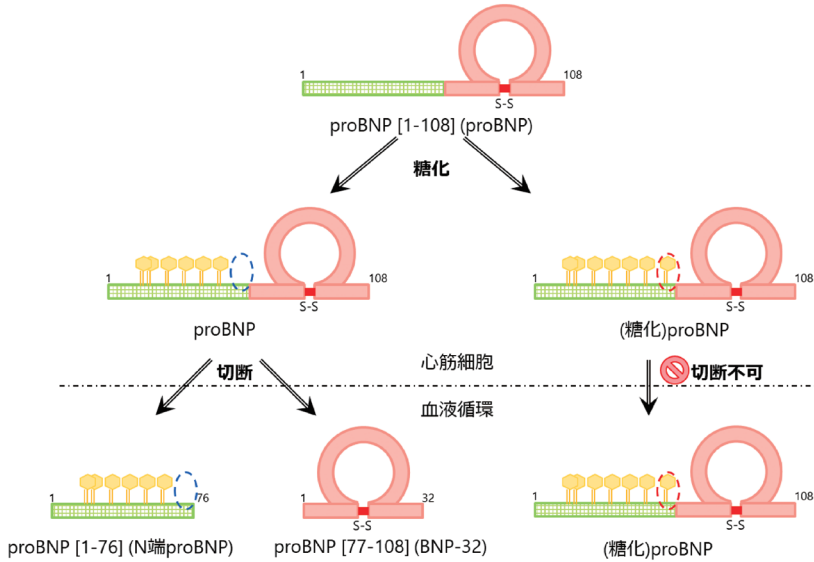


Fig. 1 生体内でのproBNP及びBNP-32の産生過程（文献<sup>13</sup>より引用）

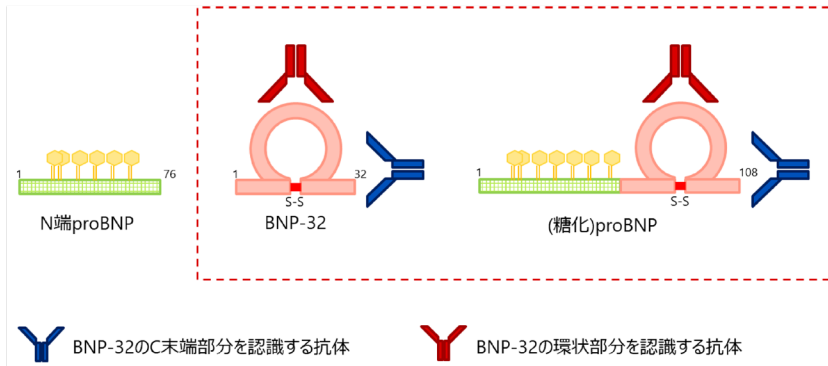


Fig. 2 一般的なBNP測定キットが測定するBNPの分子種

比率を算出した。この検討におけるproBNP分別測定キットは、proBNPのN端領域を認識し、proBNPとは結合するが、BNP-32とは結合しない抗体と、proBNP及びBNP-32のいずれとも結合する抗体とを用いることで、proBNPを特異的に測定している (Fig. 3)。このproBNP分別測定キットが実際にBNP-32に対して交差反応性を示さないことはNishikimiらが報告している<sup>14)</sup>。

同じ検体を「シオノリア® BNP」と同じ製造処方により作製された試薬 (IRMA法BNP測定キット) を用いて測定し、BNP測定値とproBNPの存在比率との関係を解析したところ、BNP濃度が高くなるほどproBNPの比率が高く

なることが明らかとなった (Fig. 4)<sup>15)</sup>。

#### 4. 製品の設計

すべてのBNP測定キットで使用可能なコントロールの処方として、まず、臨床検体に近い組成の試料とするため、ヒト血漿をベースとし、キット間でのマトリックスの影響を抑えることにした。また、上に述べた、臨床検体におけるBNPの各分子形の存在比率を反映するよう、proBNPとBNP-32の両方を添加し、さらに、添加比率をtotal BNPの濃度によって変えることにした。さらに、診断で重要なBNP濃度域で精度管理できるよう、Table 1に示したカットオフ値に即した、40及び200 ng/L付近の2濃度を設定

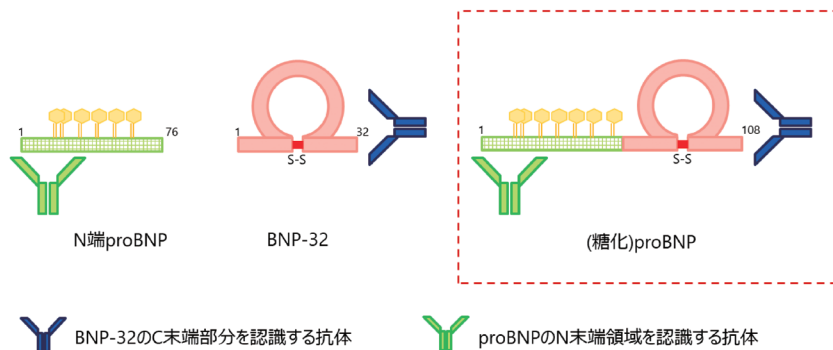


Fig. 3 proBNP分別測定キットによるproBNP特異測定 の原理

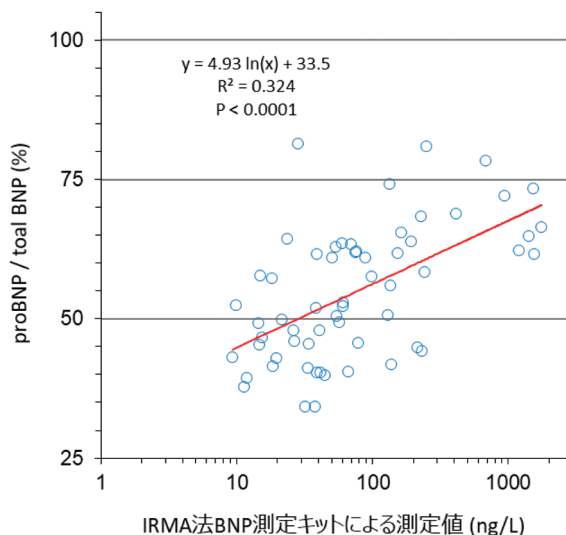


Fig. 4 BNP濃度とproBNPの存在比率の関係 (文献<sup>15)</sup> より引用)

した。

製品の剤型は、冷蔵での保管・流通が可能となるよう凍結乾燥品とし、1箱あたりLevel 1 (40 ng/L付近) 及びLevel 2 (200 ng/L付近) を3本ずつ (1本は0.5 mL分)、計6本の構成とした。製品の写真をFig. 5に示す。

### 5. 参考値の値付け

製品のロットごとに参考値を設定する。参考値は、使用方法 (Ⅲ.1.を参照) に則り調製した各濃度の試料について、前述したIRMA法BNP測定キットにより、複数回繰り返して測定し、その平均値に基づいた幅で設定する。設定した参考値は、製品に封入する使用説明書に記載し



Fig. 5 「BNPコントロール シオノギ」の製品写真 ている。

Ⅲ. 製品の使用方法と基本性能

1. 使用方法

各濃度の瓶に精製水を正確に0.5 mL加え、ゴム栓及びキャップを付けて5分間静置した後、穏やかに5~6回転倒混和し溶解して使用する。

2. 繰返し測定の実現性

前述した設計のとおり製造した「BNPコントロール シオノギ」(以下、本製品)を用いて、同時再現性、日間差及び施設間差の繰返し測定の実現性を検討した。IRMA法BNP測定キットにより、測定日を変えて、測定日ごとに使用方法のとおり調製した各濃度の試料をn=3で測定した。また、別の測定施設でも各濃度の試料を調製しn=4で測定した。

同時再現性の変動係数(CV)は2.2%~11.6%であった(Table 4)。また、測定日間差(施設1での1回目の平均値に対する2回目の平均値の比率)はLevel 1で99.0%、Level 2で85.9%であり、施設間差(施設1での全平均値に対する施設2での平均値の比率)はLevel 1で100.0%、Level 2で105.3%であった(Table 4)。

3. 製品の保存安定性と有効期間

本製品を用いて、保存安定性を検討した。本製品2ロットを8℃に保存して、製造から6、13及び19箇月後に、使用方法のとおり各濃度の試料を調製し、それぞれIRMA法BNP測定キットによりn=3で測定する一連の操作を2回ずつ繰り返した。検討に用いた2ロットの各濃度とも、19箇月後までロットごとに設定した参考値の範囲内で安定した測定値を維持していた(Table 5)。

この検討結果に基づき、本製品の有効期間は製造後18箇月間とすることにした。使用期限は本製品の外箱及び各濃度の瓶ラベルに表示している。

4. 試料調製後の安定性

本製品を用いて、試料調製後の安定性についても検討した。使用方法のとおり調製した後、冷蔵(2~8℃)で6時間保存した各濃度の試料と、調製直後の各濃度の試料をそれぞれIRMA法BNP測定キットによりn=2で測定し、測定値を比較した。また、使用方法のとおり調製した後、凍結(-20℃)で4週間保存し、融解した直後の

Table 4 繰返し測定の実現性(同時再現性、日間差及び施設間差)

測定試料	施設 1 1 回目	施設 1 2 回目	施設 2	施設 1 内 日間差 <sup>※1</sup>	施設間差 <sup>※2</sup>
Level 1 測定値 (ng/L)	34.7	36.2	39.3	99.0%	100.0%
	43.0	41.4	38.8		
	39.6	38.5	37.8		
			39.7		
平均値 (ng/L)	39.1	38.7	38.9		
	全平均値 38.9				
同時再現性 CV (%)	10.7	6.8	2.2		
Level 2 測定値 (ng/L)	208.7	180.5	187.2	85.9%	105.3%
	167.2	164.4	184.8		
	202.3	151.8	196.1		
			186.5		
平均値 (ng/L)	192.8	165.6	188.6		
	全平均値 179.2				
同時再現性 CV (%)	11.6	8.7	2.2		

※1 施設 1 での 1 回目の平均値に対する 2 回目の平均値の比率

※2 施設 1 での全平均値に対する施設 2 での平均値の比率

Table 5 製品の保存安定性

測定試料	6箇月後		13箇月後		19箇月後		全期間平均 [CV]
	1回目	2回目	1回目	2回目	1回目	2回目	
Level 1 第1ロット	39.1	38.7	34.2	36.8	34.5	36.6	36.6 [5.6%]
Level 2 第1ロット	192.8	165.6	175.9	176.6	176.8	174.4	177.0 [5.0%]
Level 1 第2ロット	34.1	34.3	34.3	34.9	32.3	35.8	34.3 [3.4%]
Level 2 第2ロット	155.4	168.2	168.9	175.5	175.1	170.7	169.0 [4.3%]

各時点 n=3 で測定した平均値を示す。

第1ロットの参考値 Level 1 : 27 ~ 46 ng/L, Level 2 : 134 ~ 201 ng/L

第2ロットの参考値 Level 1 : 25 ~ 42 ng/L, Level 2 : 130 ~ 195 ng/L

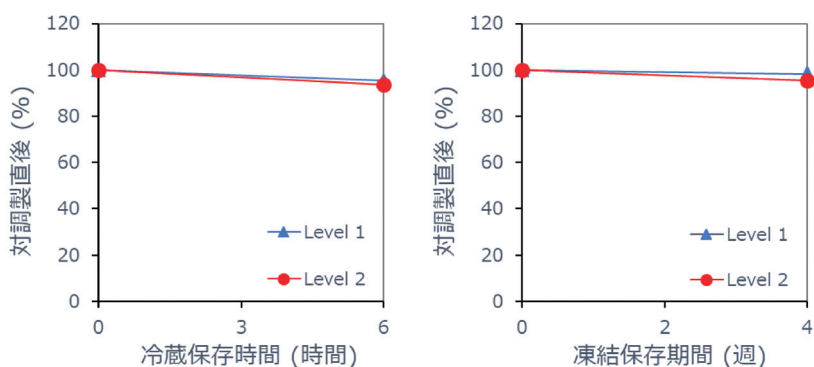


Fig. 6 調製後の安定性 (左：冷蔵保存、右：凍結 (-20℃) 保存)

各濃度の試料と、調製直後の各濃度の試料をそれぞれIRMA法BNP測定キットによりn=3で測定し、測定値を比較した。

調製直後の試料と冷蔵保存6時間後の試料の間で測定値にほとんど差がなかった (Fig. 6)。また、調製後に冷凍保存し測定直前に融解すれば、凍結融解の影響を受けることはなく、4週間後でも測定値はほとんど変化しないことがわかった (Fig. 6)。データは示さないが、調製後に常温で4時間放置した場合や、冷蔵で24時間保存した場合には10%を超える測定値の低下を認めた。

#### IV. 終わりに

「BNPコントロール シオノギ」は、ヒト血漿に対して、臨床検体を模した比率でproBNPとBNP-32を添加して調製していることから、

BNP測定キットを問わず、各医療機関での内部精度管理に用いる管理試料として使用できる。また、BNP測定値の施設間差を調査する外部精度管理用の試料としても用いることが可能であろう。

現在はIRMA法BNP測定キットによる測定結果に基づき設定している参考値の算出方法について、今後、アミノ酸分析に基づく値付けなど、より信頼性の高い算出方法を検討することが課題であると考えている。

本論文内容に関連する著者の利益相反:なし

#### 文献

- 1) Sudoh T, Maekawa K, Kojima M, Minamino N, Kangawa K and Matsuo H: Cloning and Sequence Analysis of cDNA Encoding a Precursor for Human Brain Natriuretic Peptide. Biochem Biophys Res Commun,

- 159: 1427-1434, 1989
- 2) Mukoyama M, Nakao K, Saito Y, Ogawa Y, Hosoda K, Suga S, Shirakami G, Jougasaki M and Imura H: Human Brain Natriuretic Peptide, a Novel Cardiac Hormone. *Lancet*, 335: 801-802, 1990
  - 3) Mukoyama M, Nakao K, Saito Y, Ogawa Y, Hosoda K, Suga S, Shirakami G, Jougasaki M and Imura H: Increased Human Brain Natriuretic Peptide in Congestive Heart Failure. *N Eng. J Med*, 323: 757-758, 1990
  - 4) Ponikowski P, Voors AV, Anker SD, Bueno H, Cleland JGF, Coats AJS, Falk V, González-Juanatey JR, Harjola V, Jankowska EA, Jessup M, Linde C, Nihoyanopoulos P, Parissis JT, Pieske B, Riley JP, Rosano GMC, Ruilope LM, Ruschitzka F, Rutten FH and Meer P: 2016 ESC Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure. *Eur Heart J*, 37: 2129-2200, 2016
  - 5) Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, Butler J, Casey Jr. DE, Colvin MM, Drazner MH, Filippatos GS, Fonarow GC, Givertz MM, Hollenberg SM, Lindenfeld J, Masoudi FA, McBride PE, Peterson PN, Stevenson LW and Westlake C: 2017 ACC/AHA/HFSA Focused Update of the 2013 ACCF/AHA Guideline for the Management of Heart Failure. *Circulation*, 136: e137-e161, 2017
  - 6) 筒井裕之 (監修)、日本循環器学会、日本心不全学会 (編集).ポケット版 急性・慢性心不全診療ガイドライン (2017年改訂版),ライフサイエンス出版,東京 (2018)
  - 7) 船附賢三、増田景一、井上洋子、西 裕史、五十嵐雅代、堀井一清、榊田 出、太田規央: BNP測定試薬における国内評価検討の実施.臨床病理,67:1103-1108,2019
  - 8) 大森智弘、當銘良也、今村ちさ、布施川久恵:BNP (brain natriuretic peptide) の検討で明らかになったメーカー間差.臨床検査,55:928-932,2011
  - 9) 村本良三、下垣里河、佐々木真由美:BNP値をどのように解釈するか? 臨床検査の立場からみた問題点.日本臨床生理学会誌,47:181-186,2017
  - 10) 厚生労働省医政局長:医療法等の一部を改正する法律の一部の施行に伴う厚生労働省関係省令の整備に関する省令の施行について (平成30年8月10日、医政発0810第1号).
  - 11) Giuliani I, Rieunier F, Larue C, Delagneau JF, Granier C, Pau B, Ferrière M, Saussine M, Cristol JP, Dupuy AM, Merigeon E, Merle D and Villard S: Assay for Intact B-Type Natriuretic Peptide Prohormone in Blood. *Clin Chem*, 52: 1054-1061, 2006
  - 12) Nishikimi, T, Minamino N, Ikeda M, Takeda Y, Tado-koro K, Shibasaki I, Fukuda H, Horiuchi Y, Oikawa S, Ieiri T, Matsubara M and Ishimitsu T: Diversity of Molecular Forms of Plasma Brain Natriuretic Peptide in Heart Failure—Different proBNP-108 to BNP-32 Ratios in Atrial and Ventricular Overload. *Heart*, 96: 432-439, 2010
  - 13) Semenov AG, Tamm NN, Seferian KR, Postnikov AB, Karpova NS, Sere-bryanaya DV, Koshkina EV, Krasnoselsky MI and Katrukha AG: Processing of pro-B-Type Natriuretic Peptide: Furin and Corin as Candidate Convertases. *Clin Chem*, 56: 1166-1176, 2010
  - 14) Nishikimi T, Okamoto H, Nakamura M, Ogawa N, Horii K, Nagata K, Nakagawa Y, Kinoshita H, Yamada C, Nakao K, Minami T, Kuwabara Y, Kuwahara K, Masuda I, Kangawa K, Minamino N and Nakao K: Direct Immunochemiluminescent Assay for proBNP and Total BNP in Human Plasma proBNP and Total BNP Levels in Normal and Heart Failure. *PLoS ONE*, 8: e53233, 2013
  - 15) Masuta K, Funatsuki K, Inoue Y, Masuda I, Nishikimi T, Nakagawa Y, Horii K, Nishi H, Igarashi M and Ota N: A Mixture of Glycosylated proBNP and BNP-32 Is a Suitable Calibrator for BNP Immunoassays. *Open Journal of Clinical Diagnostics*, 9: 51-63, 2019